PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
XXXX, XX(XX): 1~13
www.pibb.ac.cn

基于“玄府–髓窍”理论探究针刺内关穴通过METTL14/m^{6}A/PTEN轴促进髓鞘生成改善孤独症的作用*

党伟利[1,2] 梁绿圆[1,2] 李予欣[1,2] 李致遥[1,2] 刘赛丹[1,2] 曹佳蕾[1,2] 马荣泽[3]
王云凯[4] 杨晓青[1,2] 魏炳琦[5] 马丙祥[1,2]**

([1] 河南中医药大学第一附属医院儿科医院，郑州 450099；[2] 河南中医药大学儿科医学院，郑州 450046；
[3] 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院，上海 200437；[4] 澳门科技大学中医药学院，澳门 999078；
[5] 河南中医药大学骨伤学院，郑州 450002）

摘要　目的　通过基因干预技术明确METTL14是否介导针刺内关穴促进孤独症谱系障碍（ASD）幼鼠髓鞘化、改善行为学的核心作用。**方法**　采用丙戊酸钠（VPA）孕鼠腹腔注射法构建ASD模型。子代雄性幼鼠于出生第1天侧脑室注射腺病毒包装的METTL14 shRNA（sh-METTL14）或其对照（sh-NC），并设置模型组。随后将幼鼠分为模型组、针刺组、针刺+sh-NC组、针刺+sh-METTL14组。针刺组于出生后第7天开始针刺内关穴，每日1次，连续21 d。通过行为学实验评估神经行为；采用实时荧光定量PCR（qRT-PCR）和蛋白质免疫印迹（WB）法验证METTL14敲低效率并检测METTL14、METTL3、PTEN表达；通过RNA免疫共沉淀-qPCR（RIP-qPCR）检测PTEN m^{6}A水平；采用透射电镜、酶联免疫吸附测定（ELISA）、免疫荧光、qRT-PCR及原代神经元培养观察髓鞘超微结构、髓鞘碱性蛋白（MBP）与神经束蛋白155（NF155）表达及树突棘密度。**结果**　在行为学上，敲低METTL14显著抵消了针刺在改善自我捋毛、旷场探索、三箱社交及水迷宫学习记忆方面的有益效应（P<0.05，P<0.01）。与针刺+sh-NC组比较，针刺+sh-METTL14组海马METTL14的mRNA和蛋白质表达显著降低（P<0.01），且针刺对METTL3、PTEN表达的上调作用被逆转（P<0.01）。同时敲低METTL14显著抑制了针刺诱导的PTEN m^{6}A水平升高（P<0.01）。在形态学上敲低METTL14削弱了针刺对髓鞘结构的改善作用，逆转了针刺对MBP的下调和对NF155的上调效应，并阻断了针刺对树突棘密度的增加（P<0.05，P<0.01）。**结论**　METTL14是针刺内关穴发挥治疗作用的关键分子。针刺内关穴通过上调METTL14，进而增强PTEN mRNA的m^{6}A甲基化修饰以稳定其表达，最终促进髓鞘发育并改善ASD幼鼠的行为学症状，初步揭示了“开玄府，通髓窍”的现代生物学内涵。

关键词　孤独症谱系障碍，针刺，内关穴，玄府，髓鞘，METTL14，m^{6}A甲基化
中图分类号　R245，R246.5　　**DOI**：10.3724/j.pibb.2025.0519　　**CSTR**：32369.14.pibb.20250519

孤独症谱系障碍（autism spectrum disorder，ASD）简称孤独症，是一组以社交互动障碍、沟通缺陷、兴趣狭窄和重复刻板行为为特征的神经发育障碍[1]，该病是导致儿童智力残疾的主要原因之一，且发病率呈逐年上升趋势[2]。美国儿童ASD发病率达3.22%，发展中国家约为1%，给家庭和社会带来沉重的健康负担[3]。ASD的病机复杂，中西医对其防治策略的探索方兴未艾。轴突髓鞘发育异常是ASD的病理机制之一，与患者的智

* 国家自然科学基金（82474569），国家中医药管理局第七批全国老中医药专家学术经验继承工作（国中医药人教函［2022］76号），2023年度河南省中医学“双一流”创建科学研究专项课题（HSRP-DFCTCM-2023-05-08），河南省中医药科学研究专项课题（2019JDZX2106，20-21ZY2111），河南省卫生健康委国家中医药传承创新中心科研专项（2023ZXZX1128）和河南中医药大学第一附属医院博士科研启动基金（2022BSJJ2001）资助。
** 通讯联系人。
Tel：0371-66211081，E-mail：mbx1963@126.com
收稿日期：2025-11-24，接受日期：2026-01-08

力、发育等临床表现及核心症状密切相关[4-5]。髓鞘形成是指少突胶质细胞（oligodendrocytes，OL）包绕新生轴突的过程[6]。磷酸酶与张力蛋白同源基因（phosphatase and tensin homolog gene，*PTEN*）突变已被确认为ASD神经发育障碍的常见病因，约占ASD病例的5%~17%[7-9]。此外，PTEN通过拮抗PI3K/AKT信号通路影响髓鞘形成[6，10]。在PTEN敲除诱导的ASD小鼠模型中，PTEN表达下调通过激活PI3K/AKT通路导致GSK3β活性降低，进而影响神经元轴突生长[11]。因此，探究PTEN表达的调控机制对ASD的潜在治疗具有重要意义。

N6-甲基腺嘌呤（N6-methyladenosine，m^6A）修饰是哺乳动物mRNA中最常见的内部RNA甲基化修饰[12]。该修饰在中枢神经系统OL成熟与髓鞘形成过程中发挥重要作用[13-15]。甲基转移酶样14（methyltransferase-like 14，METTL14）作为m^6A甲基转移酶，可调控mRNA的m^6A修饰水平[16]。现有研究表明，METTL14通过增强PTEN的m^6A富集促进其表达，进而影响肿瘤生长发育[17-18]。此外，METTL14还能通过PTEN调控的PI3K/AKT信号通路影响糖尿病肾小管上皮细胞的上皮-间质转化过程[15]。然而，METTL14是否通过调控PTEN基因表达影响髓鞘形成尚待深入研究。

中医学认为ASD发病本质为“神机化灭，气立孤危”导致“窍闭神昏”，进而引发多种症状[19]。中医学“玄府”理论认为，玄府是气液流通、神机出入的微观孔窍，其“闭塞”是神志疾病的核心病机[20]。现代研究推测，髓鞘、突触等神经微结构的结构与功能状态与“玄府”的开阖密切相关[21]。针刺内关具有调气血、化痰浊、充脑髓、安心神、调脏腑、开玄府等功效，针刺内关穴“开通玄府”的功效在微观层面可能涉及对基因表达程序的精确调控。前期研究证实针刺内关可通过调控PI3K/AKT信号通路发挥神经保护作用，促进神经髓鞘重塑以调节浅层末梢神经机能[11]。我们前期研究发现针刺内关可缓解ASD患儿的核心症状[22]，但其具体作用机制尚未明确。

本研究旨在阐明针刺内关促进髓鞘重塑并改善ASD症状的具体机制。通过构建ASD幼鼠模型，观察针刺内关治疗对其神经行为及海马区髓鞘形成相关标志物的影响。我们在前期工作基础上提出科学假说：针刺内关穴“开玄府、通髓窍”的治疗作用在分子层面可能通过调控METTL14介导的PTEN m^6A甲基化这一关键环节来实现，从而将中医微观病机与现代表观遗传调控机制相联系。为验证此假说，本研究通过在体敲低ASD幼鼠海马METTL14，观察其对针刺疗效的影响，旨在从METTL14-PTEN m^6A轴深入阐明针刺内关穴治疗ASD的分子机制，为“开玄府，通髓窍”理论提供现代生物学阐释。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取SD雌雄大鼠（8~10周龄）共16只，其中雌12只，雄4只，体质量200~250 g，购自郑州大学（河南省实验动物中心），生产许可证号：SCXK（豫）2022-0001。所有大鼠饲养于无特定病原体的环境中，室内恒温（21~23℃）、恒湿（50%~60%），每日保证充足饲料、饮水及自由活动空间。适应性饲养1周后开始实验。本实验方案经河南中医药大学实验动物福利与伦理委员会批准（批准号：IACUC-202305023）。实验过程严格按照中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关规定。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂：丙戊酸钠（S161023，上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；腺病毒包装的METTL14 shRNA及其对照空病毒（LV75011002，上海汉恒生物科技有限公司）；苏木素染色液（G1004）、伊红染色液（G1001）、电镜固定液（G1102）、DAB显色试剂盒（G1212-200T）、TRIzol试剂（G3013，武汉赛维尔生物科技有限公司）；锇酸（18456，美国Ted Pella公司）；812环氧树脂包埋试剂盒（90529-77-4，美国SPI-chem公司）；Neurobasal神经元培养基（PM151223）、B-27神经细胞添加剂（武汉普诺赛生命科技有限公司）；MBP ELISA试剂盒（E-EL-M0805c，武汉伊莱瑞特生物科技有限公司）、NF155 ELISA试剂盒（AD42453，杭州艾迪康医学检验中心有限公司）；PTEN一抗（ab267787）、METTL14一抗（ab309096）、METTL3一抗（ab195352）、GAPDH一抗（ab9485，美国Abcam公司）；MBP一抗（A11162，武汉爱博泰克生物技术有限公司）；

NF155一抗（GTX37602，美国GeneTex公司）；Cy3标记山羊抗兔IgG（A0516，上海碧云天生物技术有限公司）；HRP标记山羊抗大鼠/兔IgG聚合物（PV-6000，北京中杉金桥生物技术有限公司）；PrimeScript RT试剂盒（RR037Q）、qRT-PCR试剂盒（RR820Q，日本Takara公司）；EpiQuik CUT&RUN m^{6}A RNA富集试剂盒（p-9018）、m^{6}A多克隆抗体（202-003，美国Epigentek公司）；硝酸纤维素膜（HF07502XSS，德国MERCK公司）；HRP标记山羊抗兔二抗（ab205718，美国Abcam公司）；亚甲蓝染色液（G1300，北京索莱宝科技有限公司）；RIPA裂解液（BL504A）、二辛可宁酸（BCA）试剂盒（BL521A，北京兰杰柯科技有限公司）；聚偏二氟乙烯（PVDF）膜（IPVH00010，美国Millipore公司）；Pierce™链霉亲和素磁珠（20164，美国Thermo Fisher公司）。

主要仪器：立体定位仪（68001，美国RWD生命科学公司）；透射电子显微镜（HT7800/HT7700，日本日立公司）；超薄切片机（Leica UC7，德国Leica公司）；荧光显微镜（BX53，日本Olympus公司）；实时荧光定量PCR仪（QuantStudio 5，美国Applied Biosystems公司）；蛋白质电泳及转印系统（Mini-PROTEAN Tetra）、化学发光凝胶成像分析系统（ChemiDoc MP，美国Bio-Rad公司）；电子天平（BCE224-1CCN，德国Sartorius公司）；视频记录与分析系统（SMART 3.0，西班牙Panlab公司）；Morris水迷宫系统（MT-200，成都泰盟软件有限公司）。

1.3 动物分组与干预方法

ASD动物模型参照文献[23]方法建立，成年雌雄SD大鼠按3：1比例合笼交配，以雌鼠出现阴道栓并检测到精子的当天记为妊娠第0.5天（GD 0.5）。于GD 12.5，孕鼠腹腔注射丙戊酸钠（sodium valproate，VPA）诱导ASD模型，剂量为600 mg/kg（以生理盐水配制），出生后第1天（PN 1）记为出生首日。VPA诱导的ASD模型幼鼠于PN 7随机分为以下干预组：VPA+针刺组：从PN 7开始每日针刺内关穴（PC6），持续至PN 21。参照《实验针灸学》大鼠穴位图谱进行定位。使用针灸针垂直刺入约1~2 mm，轻微平补平泻捻转（以拇指与食指持针，捻转频率约为2 Hz，即每秒约2个往复）15 s以模拟临床得气感，操作后留针30 min，旨在保证刺激量的相对一致性与可重复性。模型组仅予相同抓取固定。VPA+针刺+sh-METTL14组：于PN 1，以Avertin麻醉幼鼠，俯卧位固定于立体定位仪，常规消毒后于左脑室定位钻孔（坐标：x=1.5 mm，y=1.1 mm，深度约2.5 mm），缓慢注射sh-METTL14腺病毒载体2 μl，留针2 min后拔针消毒。每只幼鼠注射1次，并按上述方法行针刺干预。VPA+针刺+sh-NC组：操作同前，注射等体积sh-METTL14阴性对照病毒，并行针刺干预。另记录VPA模型组幼鼠于PN 7、PN 14及PN 21的体重，以及活产与死产数量，以评估生殖发育情况。行为学测试结束后，通过麻醉处死各组幼鼠并获取脑组织标本。METTL14干扰序列如表1所示，敲低序列根据结果选取sh-METTL14-1（图2a）。

Table 1 METTL14 knockdown sequences

Gene	Knockdown sequence
sh- METTL14-1	CCGGAGCATTGGTGCTGTGTTAAATCTCGAG ATTTAACACAGCACCAATGCTTTTTTG
sh- METTL14-2	CAAAAAAGCATTGGTGCTGTGTTAAATCTCGAG ATTTAACACAGCACCAATGCTCCGG

1.4 行为学测试

1.4.1 旷场实验

将幼鼠置于底部标有16个等面积正方形的实验箱中[24]。在安静环境下，将每只小鼠轻置于箱体中央方格，迅速轻柔关闭顶盖后，通过视频记录系统记录10 min内大鼠活动情况。统计分析大鼠在旷场中的总的穿格次数（四肢跨越方格次数）与边缘穿行次数。

1.4.2 自我捋毛实验

采用与旷场实验同样的木质敞箱。摄像头安装

于箱子正上方。将4组待测幼鼠提前1 h送入行为学检测室适应环境并保证测试环境安静、幽暗，并始终在同一地点。不同批次幼鼠测试时间尽量保持固定将待测幼鼠放置到敞箱中使其适应性活动5 min，随后录像并观察10 min内其在敞箱中梳理自身各区域的总时间。

1.4.3 三箱社交实验

采用塑料透明三室箱（120 cm×45 cm×40 cm），2块可活动透明塑料板将其隔为三室（chamber），每室长约40 cm，摄像头安装于箱子正前方。将待测幼鼠提前1 h送入行为学检测室适应环境，并保证测试环境安静、幽暗，并始终在同一地点。不同批次幼鼠测试时间尽量保持固定。将待测幼鼠放置于中间chamber中，适应性活动5 min；随后抽离2块活动塑料板，使幼鼠在3个chamber中适应性活动5 min，拿出待测鼠。在左右chamber分别放置空鼠笼（object）和陌生幼鼠*1*（stanger *1*），测试待测幼鼠社会交往能力。此时左室为空箱，右室为社交箱。待测幼鼠置于中间chamber，抽离2块塑料板，录像并观察第1个10 min内待测幼鼠在3个chamber中停留的时间和stranger *1*以及object的嗅触交互时间。将待测幼鼠拿出，在object一侧空笼子中放入另一只与待测幼鼠同性别的陌生幼鼠（stranger *2*），测试待测幼鼠对新鲜事物的偏好程度。再度放入待测幼鼠于中间chamber，抽离2块塑料板，录像并观察第2个10 min内待测幼鼠分别在3个chamber中停留的时间以及与stranger *1*（这时视为熟悉幼鼠）和stranger *2*的嗅触交互时间。检测结束后，取出幼鼠，用70%乙醇清洁鼠笼，待其干燥后继续测试。

1.4.4 水迷宫实验

采用Morris水迷宫，进行迷宫适应练习及游泳能力检测、定位航行实验、空间探索实验，检测幼鼠学习记忆能力。观察记录幼鼠寻找并爬上平台的路线图及隐匿平台逃避潜伏期（escape 1atency period，Elp），最多记录120 s，Elp越短成绩越好。末次训练结束后，撤去平台，面向池壁任选一入水点放入水中，用摄像机拍摄幼鼠游泳轨迹，记录在120 s内搜索平台的线路图，并计算其穿越原平台所在位置的次数，穿台次数越多成绩越好。

1.5 样本采集与检测

1.5.1 轴突髓鞘透射电镜观察

按既往文献[25]方法观察幼鼠髓鞘形成情况。取浸泡于电镜固定液的新鲜组织，切成1 mm^3组织块，4℃固定保存。经0.1 mol/L磷酸盐缓冲液（pH7.4）漂洗3次后，置于1%锇酸中浸泡，室温避光条件下乙醇梯度脱水。采用812环氧树脂包埋试剂盒进行包埋，60℃烘箱聚合48 h后，用超薄切片机制备超薄切片并装载于铜网。经2%醋酸铀饱和乙醇溶液避光染色后，于透射电镜下观察并拍摄胼胝体区轴突髓鞘结构。

1.5.2 髓鞘与树突棘检测

参照文献[26]方法进行海马神经元原代培养。将分离的海马神经元接种于含2% B-27神经细胞添加剂的Neurobasal神经元培养基中培养。PBS冲洗2次后，于37℃、5% CO_2条件下用HBLV-ZsGreen病毒感染神经元。24 h后更换为新鲜完全培养基。采用荧光显微镜观察神经元树突棘密度。

1.5.3 敲低效率验证

从海马组织中提取总RNA和蛋白质。通过qRT-PCR检测METTL14的mRNA表达水平，通过蛋白质免疫印迹（Western blot，WB）分析其蛋白表达水平。两项分析均以GAPDH作为内参。

1.5.4 酶联免疫吸附测定（ELISA）

按ELISA试剂盒说明书操作。分别采用MBP ELISA试剂盒与NF155 ELISA试剂盒检测脑组织中髓鞘碱性蛋白（myelin basic protein，MBP）与神经束蛋白155（neurofascin 155，NF155）水平。

1.5.5 实时荧光定量PCR（qRT-PCR）

采用TRIzol试剂提取总RNA，使用PrimeScript RT试剂盒反转录为cDNA。以GAPDH为内参，通过qRT-PCR试剂盒检测METTL14、METTL3和PTEN的表达水平。每个反应重复3次，采用$2^{-\Delta\Delta CT}$法分析数据。qRT-PCR所用引物序列见表2。

1.5.6 蛋白质免疫印迹（WB）

使用RIPA裂解液裂解组织细胞，并用二辛可宁酸试剂盒定量后，通过SDS-PAGE分离蛋白并转至聚偏二氟乙烯膜。室温下5% BSA封闭1 h，随后与METTL14（1：1 000）、METTL3（1：1

Table 2 Primers for qRT-PCR and RIP-qPCR

Gene	Forward primer sequence （5'－3'）	Reverse primer sequence （5'－3'）
PTEN	ACCAGGACCAGAGGAAACCT	CCTTGTCATTATCCGCACGC
METTL14	GGAGGAGGGTTTGCGTTTTG	CGGCCTTTGGATCTAGGGTC
METTL3	TGCAGACCGACTCTTTCCAC	ATCCAGTTGGGCTGCACATT
GAPDH	AACCCTCAACAGGGATGCTT	GTTCACACCGACCTTCACCA

000）、PTEN（1：1 000）及GAPDH（1：1 000）一抗4℃孵育过夜。TBST洗涤3次后，与HRP标记山羊抗兔二抗（1：1 000）37℃孵育2 h。最后利用化学发光显色和凝胶成像分析系统检测组织中METTL14、METTL3和PTEN的蛋白条带亮度。

1.5.7 RNA免疫共沉淀-qPCR（RIP-qPCR）

通过TRIzol试剂提取总RNA，参照EpiQuik CUT&RUN m^{6}A RNA富集试剂盒说明书制备含m^{6}A多克隆抗体的磁珠。RNA与m^{6}A抗体磁珠在4℃下旋转孵育2 h，经200 μl洗脱缓冲液50℃洗脱1 h后，分离共沉淀RNA并按前述方法进行qRT-PCR检测。引物序列见表2。

1.5.8 RNA m^{6}A斑点印迹检测

将总RNA点样至硝酸纤维素膜，先后通过302 nm紫外交联和5%脱脂牛奶封闭。PBST洗涤后，膜与m^{6}A抗体4℃孵育过夜，随后与HRP标记山羊抗兔二抗孵育2 h。最后采用增强化学发光显色液显色，0.1%亚甲蓝染色液复染膜片。

1.6 统计学分析

所有实验均独立重复3次。采用GraphPad Prism 9.5统计软件进行数据分析，数据以均数±标准误表示。两组间比较采用Student’s *t*检验，多组间比较采用单因素方差分析，事后多重比较采用Tukey检验。$P<0.05$认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 针刺内关通过上调METTL14改善ASD幼鼠行为症状

对ASD幼鼠生长状况的分析显示，敲低METTL14逆转了针刺内关对体重尾长增长的促进作用以及对刻板理毛行为的改善作用（图1a－c）。旷场实验观察到，针刺内关治疗诱导的ASD幼鼠探索行为增强可被METTL14敲低所抑制（图1d－f）。此外，METTL14敲低逆转了针刺内关治疗对ASD幼鼠社交能力的增强作用（图1g，h）。水迷宫实验结果证实，METTL14敲低导致针刺内关治疗对ASD幼鼠学习能力的提升作用减弱（图1i）。由此可见，针刺内关通过上调METTL14来减少ASD幼鼠的刻板行为并改善其社交与学习能力。

2.2 针刺内关通过增强METTL14介导的m^{6}A甲基化促进PTEN表达与髓鞘重塑

为了探究METTL14在针刺内关发挥治疗效果中的作用，对ASD幼鼠实施METTL14敲低处理并验证了敲低效率（图2）。由于METTL14常与METTL3形成稳定的甲基转移酶复合物共同执行m^{6}A修饰功能[16]，为评估针刺及METTL14敲低对该复合物的整体影响，我们同时检测了METTL3的表达。qRT-PCR与WB检测显示，敲低METTL14可消除针刺内关对ASD幼鼠海马组织中METTL14、METTL3和PTEN水平的提升作用（图3a－c）。免疫组化与RIP-qPCR结果证实，敲低METTL14同样抑制了针刺内关引起的ASD幼鼠海马组织PTEN表达及其m^{6}A水平升高（图3d，e）。此外，敲低METTL14逆转了针刺内关对ASD幼鼠髓鞘损伤的改善作用（图4a）。通过ELISA、免疫荧光与qRT-PCR检测发现，敲低METTL14还阻碍了针刺内关诱导的ASD幼鼠MBP水平降低与NF155水平升高（图4b－d）。与针刺+敲低对照组相比，针刺+敲低METTL14组幼鼠海马神经元树突棘密度显著降低（图4e）。以上结果表明，在ASD幼鼠模型中，针刺内关通过增强METTL14介导的m^{6}A甲基化促进PTEN表达，进而推动髓鞘重塑与海马神经元修复。

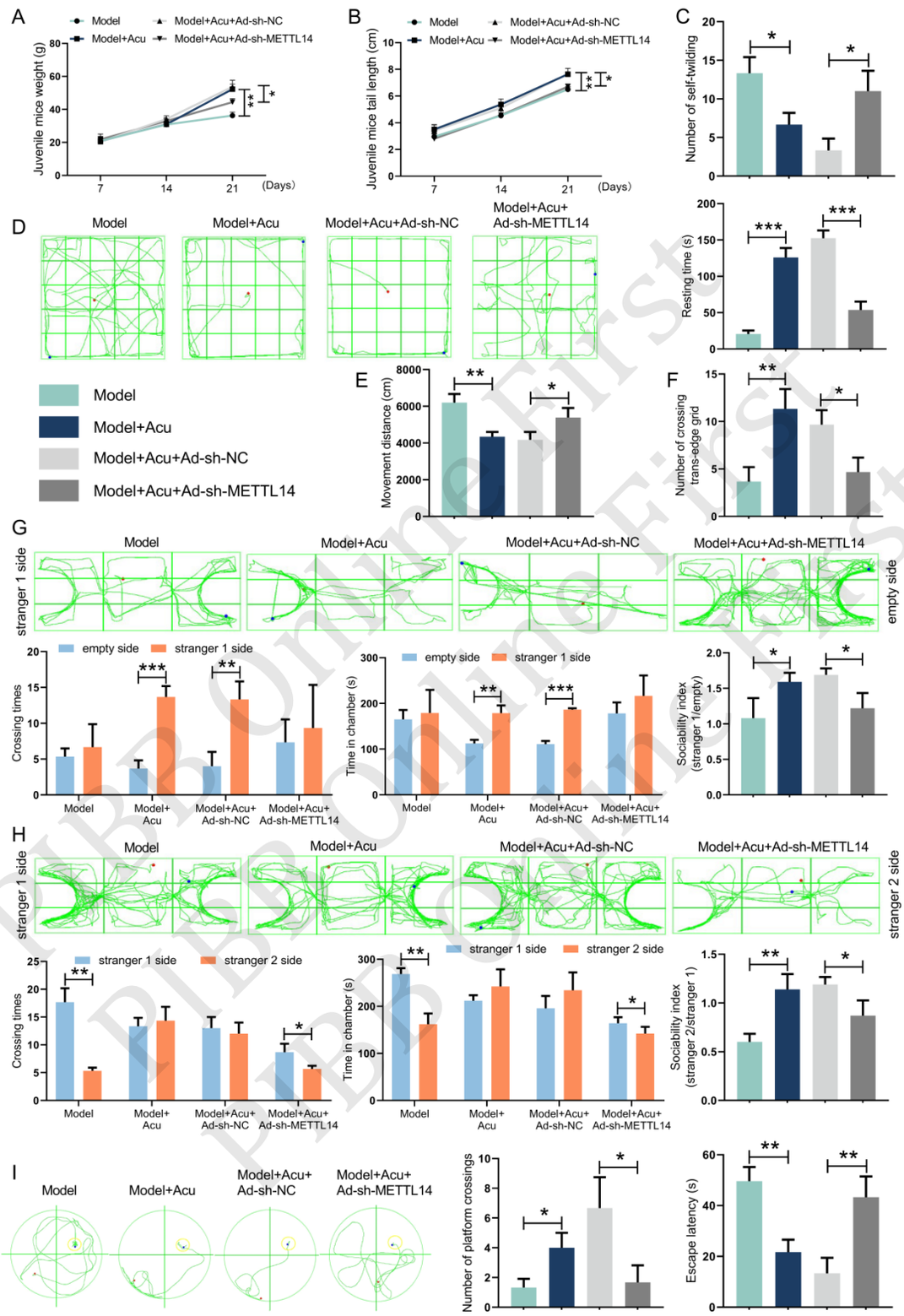


Fig. 1　Acupuncture at Neiguan point improved behavioral disorders in ASD juvenile rats by regulating METTL14

（a－c） Effects of METTL14 knockdown on the improvements in body weight， tail length growth， and self-grooming frequency induced by acupuncture at Neiguan （PC6） in ASD juvenile rats. （d－f） Effects of METTL14 knockdown on the enhanced exploratory behavior induced by acupuncture at Neiguan， as evaluated by the open field test. （g－i） Effects of METTL14 knockdown on the improvements in social ability （three-chamber social test） and learning ability （Morris water maze test） induced by acupuncture at Neiguan in the ASD model. *P<0.05， ** P<0.01， *** P<0.001.

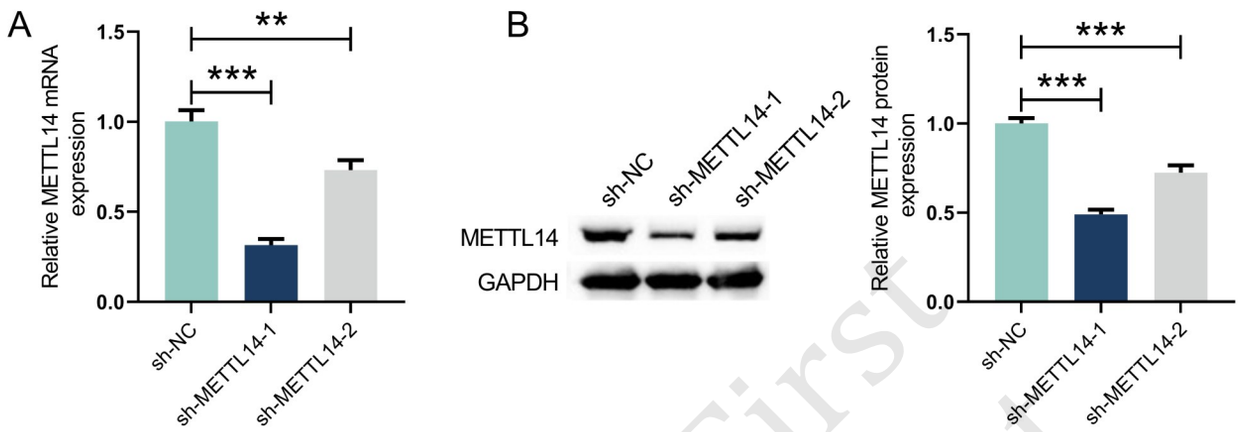


Fig. 2 The transfection efficiency of knockdown METTL14 was measured

The mRNA （a） and protein （b） levels of METTL14 were detected by qRT-PCRand Western blot， respectively. ** P<0.01， *** P<0.001.

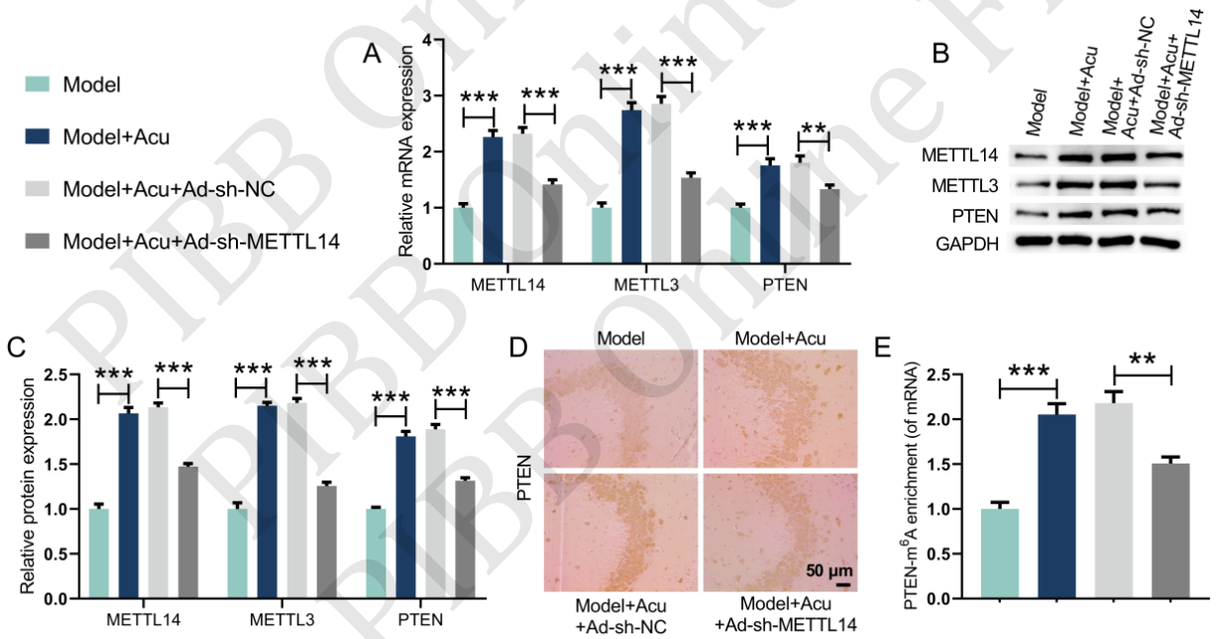


Fig. 3 Acupuncture at Neiguan point influenced PTEN expression by regulating METTL14–mediated m^{6}A methylation

（a－c） The effects of METTL14 knockdown on the expression of METTL14， METTL3， and PTEN in the hippocampal tissue of ASD model rats treated with acupuncture at Neiguan （PC6） were evaluated by qRT-PCR and Western blot. （d） The effect of METTL14 knockdown on the acupuncture-induced regulation of PTEN expression in ASD juvenile rats was observed by immunohistochemistry. （e） The effect of METTL14 knockdown on the acupuncture-induced increase in PTEN m^{6}A levels in hippocampal tissue was detected by RIP-qPCR. ** P<0.01， *** P<0.001.

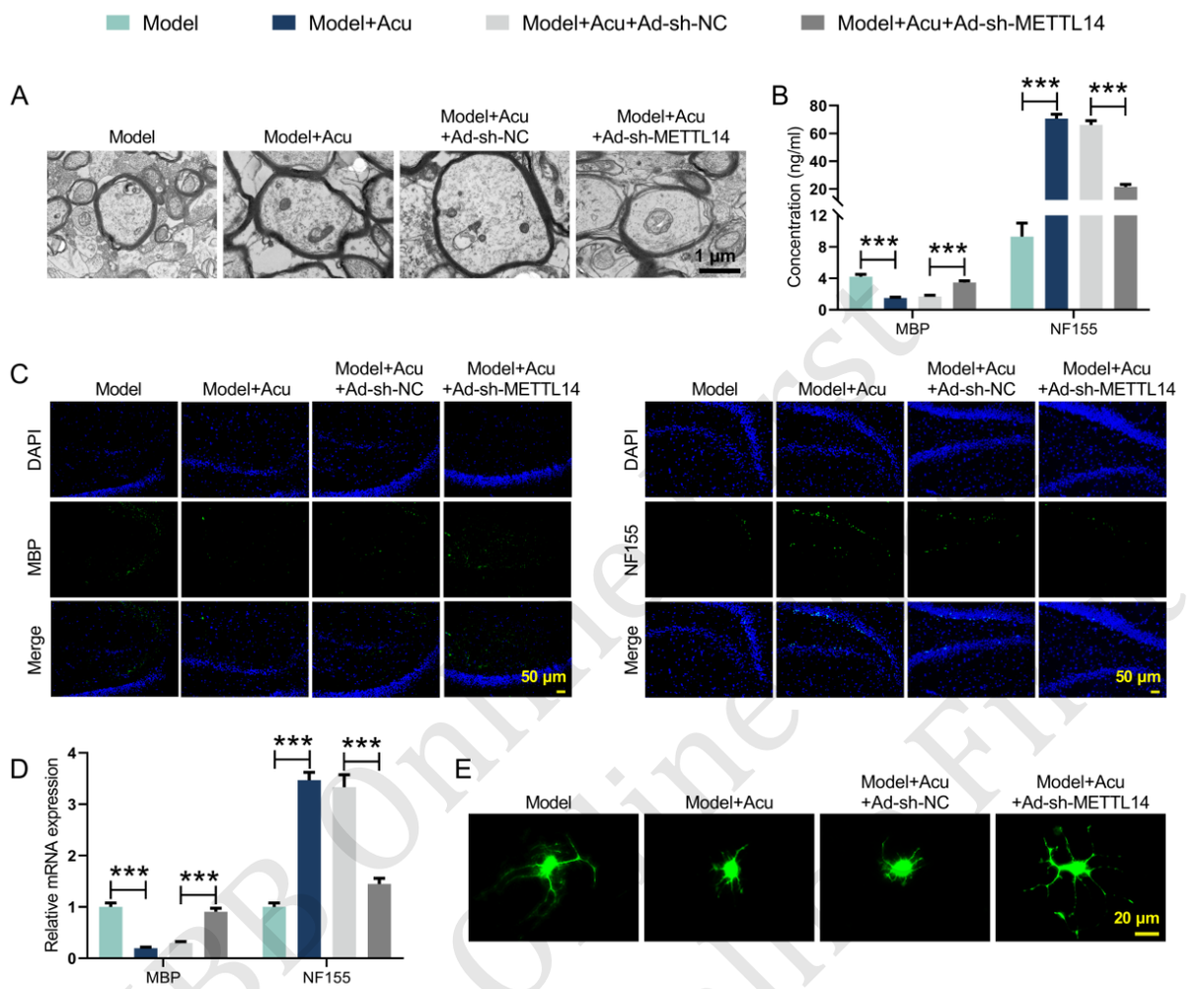


Fig. 4　Acupuncture at Neiguan point enhanced myelination and dendrite spine density in ASD models by promoting METTL14–mediated upregulation of PTEN

（a） The effect of METTL14 knockdown on the acupuncture-induced promotion of axonal myelination in ASD juvenile rats was assessed by transmission electron microscopy （TEM）. （b – d） The effect of METTL14 knockdown on the acupuncture-induced alterations in MBP and NF155 levels in the ASD model was detected by ELISA， immunofluorescence， and qRT-PCR， respectively. （E） The effect of METTL14 knockdown on the acupuncture-induced increase in dendritic spine density was observed via primary culture of hippocampal neurons from juvenile rats. ***P<0.001.

3　讨 论

本研究首次将“玄府-髓窍”理论与RNA表观遗传修饰轴相整合。中医认为“玄府”闭塞则神机不运，现代研究提示METTL14作为关键的m^{6}A甲基转移酶，其功能可视为调控“微观孔窍”开阖的分子开关。当METTL14表达或功能受损，可导致PTEN等关键基因的m^{6}A修饰异常（窍闭），进而引起下游髓鞘发育障碍（髓窍不通）。针刺内关通过上调METTL14恢复了PTEN mRNA的m6A修饰与稳定表达（开玄府），最终促进髓鞘生成、改善行为（通髓窍）。这为“玄府-髓窍”理论提供了可量化的分子生物学内涵。文章基于“玄府-髓窍”理论，提出髓窍即玄府在脑髓中的微观体现。由于ASD的病因高度复杂，涉及基因突变、母体免疫激活及环境因素等，目前尚无足够有效的物理或药物疗法[27]。中医学认为ASD的核心病机在于“神机不运，窍闭神昏”，其病位在脑，与心、肝、肾等脏腑功能失调密切相关。“玄府”作为气液流通、神机出入之微观孔窍，其开阖失常则导致神机运转

不利，出现神识昏蒙、社交障碍、言语不利等症。本研究从“玄府-髓窍”理论出发，提出“髓窍”为玄府在脑髓中的具体体现，其通利与否直接影响髓海充盈与神机运转。现代研究提示髓鞘作为神经信息传导的关键结构，其发育不良可视为“髓窍不通”的微观表现。轴突髓鞘形成异常和PTEN基因已被证实与ASD的神经发育障碍密切相关[4，7-9]。VPA啮齿类动物模型已成为研究ASD神经生物学的经典模型[28]。产前暴露于VPA的啮齿类动物表现出与ASD患者相似的缺陷特征[29]。目前ASD的诊断主要依据行为学障碍[30]，旷场实验、三室社交实验和水迷宫实验分别通过评估探索与焦虑行为、社交能力以及学习记忆能力，成为评价ASD样核心行为的有效手段[31-33]。多项研究表明髓鞘形成异常与ASD相关，并影响神经中枢的信息处理与认知功能[34-36]。ASD幼儿及学龄前儿童存在髓鞘发育紊乱[37]。海马脱髓鞘小鼠模型可出现神经元休眠及认知功能下降[38]。MBP作为神经髓鞘的重要组成部分，限制中枢神经系统的髓鞘形成[39]。而NF155作为髓鞘与轴突相互作用的关键分子，在脱髓鞘疾病中表达降低[40]。PTEN突变与ASD的强遗传关联性使其成为ASD病理生理研究的典型模型[41]。PTEN突变可驱动ASD模型中的髓鞘形成异常[42]。已有研究发现METTL14介导的m^{6}A甲基化可通过调控PTEN表达影响疾病进程[15，18，43]。此外，METTL14介导的m^{6}A甲基化对中枢神经系统髓鞘形成至关重要[14]。然而，METTL14介导的m^{6}A甲基化在ASD疾病中对PTEN及髓鞘形成的作用尚未明确。本研究结果表明，敲低METTL14可导致PTEN的mRNA表达及m^{6}A水平降低，且能逆转针刺内关对PTEN表达的增强作用、对髓鞘形成的促进作用以及对ASD典型行为的改善作用。这一过程可诠释为“针刺内关，开玄府以通髓窍”的现代生物学机制，针刺通过调畅气血、通达玄府，进而促进“髓窍”通利，使髓海得充、神机得复，从而改善ASD患儿的核心症状。由此证实，针刺内关通过“开玄府，通髓窍”促进METTL14介导的PTEN表达上调缓解ASD症状。另外需注意的是敲低METTL14后METTL3的表达也发生下调，这可能由于METTL14与METTL3在复合物中相互稳定，一方缺失会导致另一方蛋白质稳定性降低，符合该复合物的已知生物学特性[16]，这提示针刺可能通过调控METTL14，进而影响整个m^{6}A甲基转移酶复合物的功能状态。在糖尿病与膀胱癌的相关研究中，METTL14可通过调控PTEN影响PI3K/AKT信号通路状态[15，43]，而针刺内关可通过调控PI3K/AKT信号通路发挥神经保护作用[44]。未来研究进一步明确PI3K/AKT信号通路在针刺内关治疗ASD中的作用，对进一步阐明ASD发病机制具有重要意义。

4 结 论

本研究首次从“玄府-髓窍”理论视角证实在VPA诱导的ASD幼鼠模型中针刺内关穴可通过上调METTL14的表达，增强PTEN mRNA的m^{6}A甲基化修饰以稳定其表达，进而促进髓鞘发育、改善行为学症状，METTL14是介导针刺治疗作用的关键分子。这个发现从METTL14/m^{6}A/PTEN轴揭示了针刺内关开玄府以通髓窍的现代生物学内涵，为中西医结合防治ASD提供了新的理论依据和潜在治疗靶点。

参考文献

[1] Hirota T, King B H. Autism spectrum disorder: a review. JAMA, 2023, **329**(2): 157-168

[2] 梁绿圆, 王艺萍, 曹佳蕾, 等. 基于"互藏思想"探析心脾两虚型儿童孤独症. 辽宁中医杂志, 2025, **52**(9): 48-51
Liang L Y, Wang Y P, Cao J L, *et al*. Liaoning J Tradit Chin Med, 2025, **52**(9): 48-51

[3] Salari N, Rasoulpoor S, Rasoulpoor S, *et al*. The global prevalence of autism spectrum disorder: a comprehensive systematic review and meta-analysis. Ital J Pediatr, 2022, **48**(1): 112

[4] Galvez-Contreras A Y, Zarate-Lopez D, Torres-Chavez A L, *et al*. Role of oligodendrocytes and myelin in the pathophysiology of autism spectrum disorder. Brain Sci, 2020, **10**(12): 951

[5] Błaszczyk B, Miziak B, Pluta R, *et al*. Epilepsy in pregnancy-management principles and focus on valproate. Int J Mol Sci, 2022, **23**(3): 1369

[6] Fraser M M, Bayazitov I T, Zakharenko S S, *et al*. Phosphatase and tensin homolog, deleted on chromosome 10 deficiency in brain causes defects in synaptic structure, transmission and plasticity, and myelination abnormalities. Neuroscience, 2008, **151**(2): 476-488

[7] Yehia L, Ni Y, Sadler T, *et al*. Distinct metabolic profiles associated with autism spectrum disorder versus cancer in individuals with germline PTEN mutations. NPJ Genom Med, 2022, **7**(1): 16

[8] Woodbury-Smith M, Lamoureux S, Begum G, *et al*. Mutational landscape of autism spectrum disorder brain tissue. Genes, 2022, **13**(2): 207

[9] Cummings K, Watkins A, Jones C, *et al*. Behavioural and psychological features of PTEN mutations: a systematic review of the literature and meta-analysis of the prevalence of autism

spectrum disorder characteristics. J Neurodev Disord, 2022, **14**(1): 1

[10] Rademacher S, Eickholt B J. PTEN in autism and neurodevelopmental disorders. Cold Spring Harb Perspect Med, 2019, **9**(11): a036780

[11] 党伟利, 梁绿圆, 曹佳蕾, 等. 针刺内关穴促进孤独症幼鼠模型髓鞘重塑实验研究. 世界中医药, 2025, **20**(17): 3111-3120
Dang W L, Liang L Y, Cao J L, *et al*. World Chin Med, 2025, **20**(17): 3111-3120

[12] Yue Y, Liu J, He C. RNA N6-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. Genes Dev, 2015, **29**(13): 1343-1355

[13] Zhou J, Wan J, Shu X E, *et al*. N(6) -methyladenosine guides mRNA alternative translation during integrated stress response. Mol Cell, 2018, **69**(4): 636-647.e7

[14] Xu H, Dzhashiashvili Y, Shah A, *et al*. M(6)a mRNA methylation is essential for oligodendrocyte maturation and CNS myelination. Neuron, 2020, **105**(2): 293-309.e5

[15] Xu Z, Jia K, Wang H, *et al*. METTL14-regulated PI3K/Akt signaling pathway *via* PTEN affects HDAC5-mediated epithelial-mesenchymal transition of renal tubular cells in diabetic kidney disease. Cell Death Dis, 2021, **12**(1): 32

[16] Oerum S, Meynier V, Catala M, *et al*. A comprehensive review of m6A/m6Am RNA methyltransferase structures. Nucleic Acids Res, 2021, **49**(13): 7239-7255

[17] Zhang L, Luo X, Qiao S. METTL14-mediated N6-methyladenosine modification of Pten mRNA inhibits tumour progression in clear-cell renal cell carcinoma. Br J Cancer, 2022, **127**(1): 30-42

[18] Yao Q, He L, Gao X, *et al*. The m6A methyltransferase METTL14-mediated N6-methyladenosine modification of PTEN mRNA inhibits tumor growth and metastasis in stomach adenocarcinoma. Front Oncol, 2021, **11**: 699749

[19] 梁绿圆, 党伟利, 苏洁欣, 等. 从"神机"与"气立"探讨孤独症谱系障碍的发病机制. 中医杂志, 2024, **65**(3): 256-260
Liang L Y, Dang W L, Su J X, *et al*. J Tradit Chin Med, 2024, **65**(3): 256-260

[20] 梁绿圆, 曹佳蕾, 王淇蓉, 等. 刍议生物电的中医理论内在根基——"营卫-三焦玄府-经脉"体系. 中医学报, 2026. https://link.cnki.net/urlid/41.1411.R.20250912.1113.002
Liang L Y, Cao J L, Wang Q R, *et al*. China Journal of Chinese Medicine, 2026. https://link. cnki. net/urlid/41.1411.R.20250912.1113.002

[21] 臧书晗, 黄娟, 胡木, 等. 基于玄府-络脉理论探析中枢神经系统脱髓鞘疾病的中医诊治思路. 中医学报, 2025, **40**(4): 787-790
Zang S H, Huang J, Hu M, *et al*. China J Chin Med, 2025, **40**(4): 787-790

[22] 党伟利, 李伟, 马丙祥. 针刺内关穴干预孤独症谱系障碍言语功能的临床研究. 中国康复医学杂志, 2022, **37**(7): 961-963
Dang W L, Li W, Ma B X. Chin J Rehabil Med, 2022, **37**(7): 961-963

[23] Zohny S M, Habib M Z, Mohamad M I, *et al*. Memantine/aripiprazole combination alleviates cognitive dysfunction in valproic acid rat model of autism: hippocampal CREB/BDNF signaling and glutamate homeostasis. Neurotherapeutics, 2023, **20**(2): 464-483

[24] 王剑飞, 韩俊海, 张子超. 孤独症谱系障碍小鼠模型行为学检测方法. 遗传, 2021, **43**(5): 501-519
Wang J F, Han J H, Zhang Z C. Hereditas, 2021, **43**(5): 501-519

[25] Wang Y, Sun B, Shibata B, *et al*. Transmission electron microscopic analysis of myelination in the murine central nervous system. STAR Protoc, 2022, **3**(2): 101304

[26] Wang G S, Hong C J, Yen T Y, *et al*. Transcriptional modification by a CASK-interacting nucleosome assembly protein. Neuron, 2004, **42**(1): 113-128

[27] 梁绿圆, 曹佳蕾, 丁圣家, 等. 中药活性成分靶向干预孤独症研究进展. 中国实验方剂学杂志, 2026. https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20250811
Liang L Y, Cao J L, Ding S J, *et al*. China Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2026. https://doi. org/10.13422/j.cnki.syfjx.20250811

[28] Jiang S, He M, Xiao L, *et al*. Prenatal GABAB receptor agonist administration corrects the inheritance of autism-like core behaviors in offspring of mice prenatally exposed to valproic acid. Front Psychiatry, 2022, **13**: 835993

[29] Danzer S C. Valproic acid leads new neurons down the wrong path. Epilepsy Curr, 2019, **19**(2): 132-133

[30] Lord C, Elsabbagh M, Baird G, *et al*. Autism spectrum disorder. Lancet, 2018, **392**(10146): 508-520

[31] Sünnetçi E, Durankuş F, Albayrak Y, *et al*. Effects of the prenatal administration of tetanus toxoid on the sociability and explorative behaviors of rat offspring: a preliminary study. Clin Psychopharmacol Neurosci, 2021, **19**(1): 84-92

[32] Hughes E M, Calcagno P, Clarke M, *et al*. Prenatal exposure to valproic acid reduces social responses and alters mRNA levels of opioid receptor and pre-pro-peptide in discrete brain regions of adolescent and adult male rats. Brain Res, 2020, **1732**: 146675

[33] Yang X, Yin H, Wang X, *et al*. Social deficits and cerebellar degeneration in Purkinje cell Scn8a knockout mice. Front Mol Neurosci, 2022, **15**: 822129

[34] Deoni S C L, Zinkstok J R, Daly E, *et al*. White-matter relaxation time and myelin water fraction differences in young adults with autism. Psychol Med, 2015, **45**(4): 795-805

[35] Stolerman E S, Smith B, Chaubey A, *et al*. CHD8 intragenic deletion associated with autism spectrum disorder. Eur J Med Genet, 2016, **59**(4): 189-194

[36] Richetto J, Chesters R, Cattaneo A, *et al*. Genome-wide transcriptional profiling and structural magnetic resonance imaging in the maternal immune activation model of neurodevelopmental disorders. Cereb Cortex, 2017, **27**(6): 3397-3413

[37] Chen B, Linke A, Olson L, *et al*. Cortical myelination in toddlers and preschoolers with autism spectrum disorder. Dev Neurobiol, 2022, **82**(3): 261-274

[38] Baltan S, Jawaid S S, Chomyk A M, *et al*. Neuronal hibernation following hippocampal demyelination. Acta Neuropathol Commun, 2021, **9**(1): 34

[39] Nave K A, Werner H B. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014, 30: 503-533

[40] Maier O, Baron W, Hoekstra D. Reduced raft-association of NF155 in active MS-lesions is accompanied by the disruption of the paranodal junction. Glia, 2007, **55**(8): 885-895

[41] Frazier T W, Embacher R, Tilot A K, *et al*. Molecular and phenotypic abnormalities in individuals with germline heterozygous PTEN mutations and autism. Mol Psychiatry, 2015, **20**(9): 1132-1138

[42] Lee H, Thacker S, Sarn N, *et al*. Constitutional mislocalization of Pten drives precocious maturation in oligodendrocytes and aberrant myelination in model of autism spectrum disorder. Transl Psychiatry, 2019, **9**(1): 13

[43] Tian J, Zhu Y, Rao M, *et al*. N(6) -methyladenosine mRNA methylation of PIK3CB regulates AKT signalling to promote PTEN-deficient pancreatic cancer progression. Gut, 2020, **69**(12): 2180-2192

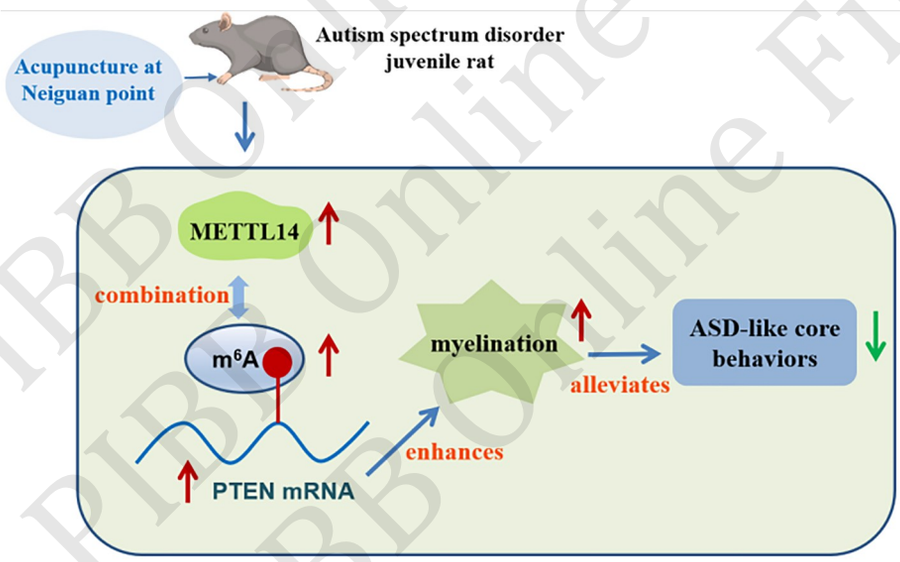
[44] Zhang L, Liu B, Du Y, *et al*. To investigate the effects of acupuncture guigou and Neiguan on PI3K/Akt signaling pathway in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2012, **39**(11): 2308-2311

Effect of Acupuncture at Neiguan (PC6) on Improving Autism by Promoting Myelination Through The METTL14/m^{6}A/PTEN Axis Based on "Xuanfu-Suiqiao" Theory*

DANG Wei-Li[1,2], LIANG Lü-Yuan[1,2], LI Yu-Xin[1,2], LI Zhi-Yao[1,2], LIU Sai-Dan[1,2], CAO Jia-Lei[1,2], MA Rong-Ze[3], WANG Yun-Kai[4], YANG Xiao-Qing[1,2], WEI Bing-Qi[5], MA Bing-Xiang[1,2]**

([1]*Pediatric Hospital, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou* 450099, China;
[2]*College of Pediatric Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou* 450046, China;
[3]*Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai* 200437, China;
[4]*School of Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macau* 999078, China;
[5]*School of Orthopedics, Henan University of Chinese medicine, Zhengzhou* 450002, China)

Graphical abstract



Abstract　Objective　To clarify whether METTL14 mediates the core role of acupuncture at Neiguan (PC6) in promoting myelination and improving behavior in young autistic rats through gene intervention technology. Methods The ASD model was established by intraperitoneal injection of valproic acid (VPA) in pregnant rats. Male offspring were intracerebroventricularly injected with adenovirus-packaged METTL14 shRNA (sh-METTL14) or its control (sh-NC) on postnatal day 1, with a model group set as well. Subsequently, the juvenile rats were divided into model group, acupuncture group, acupuncture+sh-NC group, and acupuncture+sh-METTL14 group. The acupuncture group received acupuncture at Neiguan (PC6) from postnatal day 7, once daily for 21 consecutive days. Neurobehavioral changes were evaluated by behavioral tests; METTL14 knockdown efficiency and the expression of METTL14, METTL3, and PTEN were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot (WB); PTEN m^{6}A levels were measured by RNA immunoprecipitation-qPCR (RIP-qPCR); myelin ultrastructure, expression of myelin basic protein (MBP) and neurofascin 155 (NF155), and dendritic spine density were observed using transmission electron microscopy (TEM), enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence, qRT-PCR, and primary neuron culture. Results Behaviorally, knockdown of METTL14 significantly counteracted the beneficial effects of acupuncture in improving self-grooming, open field exploration, three-chamber social interaction, and Morris water maze learning and memory (P<0.05, P<0.01). Compared with the acupuncture+sh-NC group, the acupuncture+sh-METTL14 group showed significantly decreased mRNA and protein expression of hippocampal METTL14 (P<0.01), and the upregulating effects of acupuncture on METTL3 and PTEN expression were reversed (P<0.01). Meanwhile, knockdown of METTL14 significantly inhibited the acupuncture-induced increase in PTEN m^{6}A levels (P<0.01). Morphologically, knockdown of METTL14 attenuated the improvement of myelin structure by acupuncture, reversed the downregulation of MBP and upregulation of NF155 induced by acupuncture, and blocked the increase in dendritic spine density (P<0.05, P<0.01). Conclusion METTL14 is a key molecule mediating the therapeutic effect of acupuncture at Neiguan. Acupuncture at Neiguan upregulates METTL14, thereby enhancing m^{6}A methylation modification of PTEN mRNA to stabilize its expression, ultimately promoting myelin development and improving behavioral symptoms in ASD juvenile rats. This preliminarily reveals the modern biological connotation of "opening Xuanfu and dredging myelin".

Key words autism spectrum disorder, acupuncture, Neiguan (PC6), Xuanfu, myelination, METTL14, m^{6}A methylation

DOI：10.3724/j.pibb.2025.0519 **CSTR**：32369.14.pibb.20250519

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (82474569), the Seventh Batch of National Academic Experience Inheritance Program for Veteran TCM Experts of the National Administration of Traditional Chinese Medicine (No. [2022]76), the 2023 Henan Provincial "Double First-Class" Initiative Scientific Research Project in Chinese Medicine (HSRP-DFCTCM-2023-05-08), the Henan Provincial Traditional Chinese Medicine Research Special Projects (2019JDZX2106, 20-21ZY2111), the Scientific Research Project of the National TCM Inheritance and Innovation Center of Henan Provincial Health Commission (2023ZXZX1128), and the Doctoral Research Initiation Fund of the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine (2022BSJJ2001).

** Corresponding author.
Tel：86-371-66211081，E-mail：mbx1963@126.com

Received：November 24，2025 Accepted：January 8，2026